






Protein (PP13), process for concentrating and obtaining it, and its use

Patent number: EP0101603
Publication date: 1984-02-29
Inventor: BOHN HANS DR; KRAUS WALTER
Applicant: BEHRINGWERKE AG (DE)
Classification:
- **international:** C07G7/00; G01N33/68
- **european:** C07K14/47A6; C07K16/18; G01N33/68T
Application number: EP19830108067 19830816
Priority number(s): DE19823230996 19820820

Also published as:

 US4500451 (A1)
 JP59059621 (A)
 EP0101603 (A3)

Cited documents:

 EP0009715
 US2042430

Report a data error here

Abstract not available for EP0101603

Abstract of corresponding document: **US4500451**

Protein PP13 is isolated from human placental tissues using a variety of methods, e.g., immunoadsorption. The protein has utility in production of an antiserum which has diagnostic applications. The placental specific proteins (e.g., PP13) are frequently detected in increasing amounts in women as pregnancy advances, and in patients with tumors especially of the tryphoblastic and embryonal types.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

19



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

11

Veröffentlichungsnummer:

0 101 603
A2

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 83108067.6

51 Int. Cl.³: **C 07 G 7/00, G 01 N 33/68**

22 Anmeldetag: 16.08.83

30 Priorität: 20.08.82 DE 3230996

71 Anmelder: **BEHRINGWERKE Aktiengesellschaft,**
Postfach 1140, D-3550 Marburg 1 (DE)

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung: 29.02.84
Patentblatt 84/8

72 Erfinder: **Bohn, Hans, Dr., Oberer Eichweg 28,**
D-3550 Marburg (DE)
Erfinder: **Kraus, Walter, Auf der Helde 15,**
D-3553 Cölbe 3 (DE)

84 Benannte Vertragsstaaten: **AT BE CH DE FR GB IT LI LU**
NL SE

74 Vertreter: **Meyer-Dulheuer, Karl-Hermann, Dr. et al,**
HOECHST Aktiengesellschaft Zentrale Patentabteilung
Postfach 80 03 20, D-6230 Frankfurt/Main 80 (DE)

54 **Neues Protein (PP13), Verfahren zu seiner Anreicherung und Gewinnung sowie seine Verwendung.**

57 Es wird das Protein PP₁₃ beschrieben, das gekennzeichnet ist durch

- a) eine elektrophoretische Beweglichkeit im Bereich von Albumin,
- b) einen isoelektrischen Punkt von $4,75 \pm 0,15$,
- c) einen Sedimentationskoeffizienten $S_{20,w}^0$ von $3,1 \pm 0,15$ S,
- d) ein in der Ultrazentrifuge bestimmtes Molekulargewicht von 30000 ± 5000 ,
- e) ein im Natriumdodecylsulfat (SDS)-haltigen Polyacrylamid-gel bestimmtes Molekulargewicht von 29000 ± 3000 ,
- f) einen Extinktionskoeffizienten $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (280nm) von $9,8 \pm 0,3$ und
- g) einen Kohlenhydratanteil von $< 1\%$ ($0,1 \pm 0,05\%$ Mannose, $0,2 \pm 0,1\%$ Galactose, $0,1 \pm 0,05\%$ Xylose, $0,2 \pm 0,1\%$ Glucosamin, Neuraminsäure nicht nachgewiesen).

Weiterhin werden ein Verfahren zur Gewinnung oder Anreicherung dieses Proteins sowie seine Verwendung angegeben.

EP 0 101 603 A2

- 1 -

Neues Protein (PP₁₃), Verfahren zu seiner Anreicherung
und Gewinnung sowie seine Verwendung

Die Erfindung betrifft ein neues Protein (PP₁₃), ein Verfahren zu seiner Anreicherung und Gewinnung aus einem Extrakt menschlicher Plazenten sowie seine Verwendung.

5

Im Extrakt aus menschlichen Plazenten wurde bereits eine Reihe löslicher Proteine, die aus diesem Gewebe stammen, nachgewiesen (Bohn, H., Placental and Pregnancy Proteins, in Carcino-Embryonic Proteins, Vol. I, Ed., F. G. Lehmann, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1979).

Die vorliegende Erfindung beschreibt die Isolierung und Charakterisierung eines neuen löslichen Proteins, genannt PP₁₃.

15

Gegenstand der Erfindung ist das Protein PP₁₃, gekennzeichnet durch

a) eine elektrophoretische Beweglichkeit im Bereich von Albumin,

20



- b) einen isoelektrischen Punkt von $4,75 \pm 0,15$,
- c) einen Sedimentationskoeffizienten $S_{20,w}^0$ von $3,1 \pm 0,15$,
- 5 d) ein in der Ultrazentrifuge bestimmtes Molekulargewicht von $30\ 000 \pm 5\ 000$,
- e) ein im Natriumdodecylsulfat (SDS)-haltigen Polyacrylamidgel bestimmtes Molekulargewicht von $29\ 000 \pm 3\ 000$,
- 10 f) einen Extinktionskoeffizienten $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (280 nm) von $9,8 \pm 0,3$,
- 15 g) einen Kohlenhydratanteil von $< 1\%$ (g/100g)
(Mannose $0,1 \pm 0,05\%$, Galactose $0,2 \pm 0,1\%$, Xylose $0,1 \pm 0,05\%$,
Glucosamin $0,2 \pm 0,1\%$, Neuraminsäure nicht nachgewiesen).
- 20 Die Aminosäurezusammensetzung von PP_{13} ist in der folgenden Tabelle angegeben:

Aminosäurezusammensetzung von PP ₁₃		
	(Reste pro 100 Reste) Mol %	Variations- koeffizient
25	Lysin	4,97
	Histidin	2,28
	Arginin	4,38
30	Asparaginsäure	12,60
	Threonin	3,94
	Serin	7,83
	Glutaminsäure	10,16
	Prolin	5,53
35	Glycin	6,13
	Alanin	3,39

	Cystin 1/2	3,73	2,93
	Valin	9,85	6,79
	Methionin	2,09	13,3
	Isoleucin	6,11	3,79
5	Leucin	5,87	0,50
	Tyrosin	3,88	4,56
	Phenylalanin	5,68	6,85
	Tryptophan	1,46	3,09

10

Zur Erläuterung der kennzeichnenden Merkmale des Gewebsproteins sei folgendes ausgeführt:

15

Die Untersuchung der elektrpphoretischen Beweglichkeit erfolgte in der Mikromodifikation mit dem Gerät Microzone R 200 von Beckman Instruments auf Zelluloseazetatfolien (Firma Sartorius) unter Verwendung von Natriumdiäthylbarbiturat-Puffer, pH 8,6.

20

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde mit einer Säule (440 ml) der Firma LKB, Stockholm, durchgeführt. Das sogenannte Ampholin(R)-Gemisch hatte bei der Untersuchung des Glykoproteins einen pH-Bereich von 4,0 bis 6,0.

25

Der Sedimentationskoeffizient wurde in einer analytischen Ultrazentrifuge der Firma Beckman(Spinco-Apparatur, Modell E) bei 60.000 UpM in Doppelsektorzellen mit Hilfe der UV-Scanner Technik bei 280 nm bestimmt. Als Lösungsmittel diente ein 0,05 M Phosphatpuffer (pH 6,8), der 0,2 Mol/l NaCl enthielt. Die Proteinkonzentration wurde auf eine optische Dichte (o.D.) von etwa 3 eingestellt. Der Sedimentationskoeffizient wurde auf die Basis von Wasser bei 20°C umgerechnet.

30

Zur Ermittlung des Molekulargewichtes in der Ultrazentrifuge wurde die Sedimentationsgleichgewichtsmethode herangezogen. Die Konzentration des Proteins ist dabei auf etwa 1.0 O.D. eingestellt worden. Die Bestimmung
5 wurde bei 9.000 UpM vorgenommen. Die Registrierung erfolgte mit UV-Optik bei 280 nm unter Einsatz des photoelektrischen Scanners.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes im SDS-PAA-Gel wurde
10 ein Gel mit 7,5% (g/100ml) Polyacrylamid(PAA), das 0,1% (g/100ml) Natriumdodecylsulfat (SDS) enthielt, verwendet. Als Vergleichssubstanz dienten humanes Plazentalaktogen (HPL) und Human-Albumin sowie dessen Aggregate.

15 Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten wurde die Substanz 0,10%ig (g/100 ml) in Aqua dest. gelöst.

Die Analyse der Kohlenhydrate wurde wie folgt durchgeführt: Nach Hydrolyse der glykosidischen Bindungen wurden die freigesetzten Neutralzucker als Boratkomplexe
20 über eine Anionenaustauschersäule getrennt (Y.C.Lee et al., Anal.Biochem. 27, 567 (1969)), im Eluat durch Zumischung von Cu(I)-bicinchoninat reagenz (K.Mopper und M.Gindler, Anal.Biochem. 56, 440 (1973)) angefärbt und
25 unter Verwendung von Rhamnose als internem Standard quantitativ bestimmt. Die Aminosucker wurden durch ihre Reaktion mit Ninhydrin nachgewiesen und bestimmt. Der Neuraminsäuregehalt ist mit der Methode nach Warren (Methods in Enzymology, Vol. VI, 463-465 (1963))
30 ermittelt worden.

Die Aminosäurenanalyse wurde nach S. Moore, D.H.Spackman, W.H.Stein, Anal. Chem. 30, S.1185 (1958), unter Verwendung des Flüssigkeitschromatographen Multichrom B der Firma Beckman durchgeführt. 1/2 Cystin wurde nach Oxidation der Proteine mit Perameisensäure (S.Moore et al., Anal. Chem. 30, S. 1185 (1958)) und nachfolgender Chromatographie (S.Moore, J.Biol.Chem., 238, S.235 (1963)) als Cysteinsäure bestimmt. Der Tryptophangehalt ist mit der direkten photometrischen Bestimmung nach H.Edelhoch, Biochemistry 6, S. 1948 (1967), ermittelt worden.

PP₁₃ hat folgende Eigenschaften, die sich in einem Verfahren zu seiner Isolierung verwenden lassen, indem diesen Eigenschaften entsprechende Maßnahmen getroffen werden:

- 1) Mit Ammoniumsulfat wird es bei pH 7,0 und 30-60% Sättigung aus wässrigen Lösungen gefällt.
- 2) Mit wasserlöslichen Acridinbasen, zum Beispiel 2-Äthoxy-6,9-diaminoacridinlactat (Rivanol^(R)) wird es bei pH-Werten zwischen 4 - 9 und einer Konzentration der Base von 0,2 bis 0,8%(g/100 ml) präzipitiert. Bei einem pH-Wert von 6,0 und einer Rivanolkonzentration von 0,4% (g/100ml) fällt es bereits zum Teil aus.
- 3) Bei der elektrophoretischen Auftrennung wandert es bei pH 8,0 ähnlich schnell wie Albumin.
- 4) Bei der isoelektrischen Fokussierung erscheint es im pH-Bereich von 4,6 bis 4,9 mit Maximum zwischen 4,7 und 4,8.
- 5) Bei der Gelfiltration mit Sephadex^(R) verhält es sich wie Proteine mit Molekulargewichten von 10 000 bis 40 000.

- 6) Es läßt sich an schwach basische Ionenaustauscher wie beispielsweise DEAE-Cellulose oder DEAE-Sephadex bei einer Leitfähigkeit von etwa 0 - 2 mS und einem pH-Wert von etwa pH 7 bis 9 binden und wird
5 erst unter Verwendung stärker konzentrierter Salzlösungen (1-5g/100 ml NaCl-Lösungen) vom Ionenaustauscher wieder eluiert.
- 7) Es kann aus einer wässrigen Lösung durch Immunsorptionsorption angereichert und isoliert werden.
10

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Gewinnung des PP₁₃, dadurch gekennzeichnet, daß ein Ex-
15 trakt aus menschlichen Plazenten, unter Verwendung der obenstehenden Eigenschaften fraktioniert wird.

Neben Ammoniumsulfat können selbstverständlich auch andere in der präparativen Biochemie üblicherweise eingesetzte
20 Neutralsalze zur Ausfällung des PP₁₃ verwendet werden. Neben einer Acridinbase ist auch ein wasserlösliches Derivat einer Chinolinbase, wie sie für Proteinfractionierungen bekannt sind, im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens einsetzbar. Entsprechend seinem elektro-
25 phoretischen Verhalten, seinem isoelektrischen Punkt, seinem Molekulargewicht, sind zur Isolierung des Proteins auch andere Maßnahmen brauchbar, die geeignet sind, ein Protein mit den angegebenen Eigenschaften von anderen Proteinen abzutrennen. Hierzu können die verschiedenen
30 Methoden der präparativen Elektrophorese, der isoelektrischen Fokussierung, der Gelfiltration, Gelchromatographie oder Ultrafiltration oder auch die Eigenschaft des PP₁₃, an schwach basische Ionenaustauscher gebunden und hiervon wieder eluiert werden zu können, verwendet werden.



Durch eine zweckmäßige Kombination der genannten Maßnahmen, die eine Anreicherung des PP₁₃ oder eine Abtrennung dieses Proteins von anderen Proteinen bewirken, kann das PP₁₃ isoliert werden.

5

Demzufolge ist der Gegenstand der vorliegenden Erfindung in den einzelnen Schritten zur Anreicherung des PP₁₃ und in dem durch Kombination der Maßnahmen zur Anreicherung sich ergebenden Verfahren zur Reinigung des PP₁₃ zu sehen.

10

Die im Beispiel angegebenen Schritte zur Anreicherung und Isolierung von PP₁₃ sind keinesfalls alle zwingend und müssen auch nicht in der dort beschriebenen Reihenfolge durchgeführt werden.

15

Zur Immunadsorption könnte man direkt den Extrakt aus menschlichen Plazenten einsetzen. Da die Konzentration von PP₁₃ im Plazentenextrakt aber relativ gering ist, ist es zweckmäßig, durch eine Vorfraktionierung des Extraktes das Protein PP₁₃ erst spezifisch anzureichern mit Hilfe von Methoden, die sich zur Fraktionierung von Proteinen in größerem Maßstab eignen; zum Beispiel durch fraktionierte Fällung mit Neutralsalzen oder organischen Kationen, durch Gelfiltration oder durch Ionenaustauschchromatographie. Auch der Schritt der Immunadsorption könnte durch Anwendung anderer Trennmethode, zum Beispiel durch präparative Elektrophorese und isoelektrische Fokussierung, ersetzt werden.

30

Zur Hochreinigung von PP₁₃ im Endstadium der Isolierung haben sich Gelfiltration an Sephadex G-100 und Inverse Immunadsorption als brauchbar erwiesen.

35

Aus einer ausgewachsenen menschlichen Plazenta (600 g) lassen sich mit physiologischer Salzlösung im Durchschnitt 3,7 mg dieses Proteins extrahieren. Extrakte anderer Organe des Menschen (zum Beispiel aus Herz, Lunge, Haut,

Magen, Niere, Uterus, Leber, Milz, Nebenniere, Colon und Blase) enthalten dieses Protein nicht oder in wesentlich geringerer Konzentration. Auch im Serum von anderen Körperflüssigkeiten des Menschen kommt PP₁₃ normalerweise
5 nicht oder nur in Spuren (< 1 mg/l) vor.

Zum Nachweis und zur Bestimmung des PP₁₃ etwa in einer Fraktion aus einer Trennoperation können neben den angegebenen Parametern auch immunchemische Methoden dienen,
10 da PP₁₃ antigene Eigenschaften hat. Bei der Immunisierung von Tieren mit diesem Protein werden spezifische Antikörper gebildet.

Ein für diesen Zweck brauchbares Antiserum kann folgendermaßen gewonnen werden: Durch Immunisieren von Kaninchen mit einer PP₁₃-enthaltenden Plazentaproteinfraktion (zum Beispiel einer Mutterlauge aus der Kristallisation von humanem Placentalactogen(HPL) nach Bohn H., *Experientia*
15 27 (1971) 1223) wird ein polyvalentes Antiserum erhalten, das unter anderem auch Antikörper gegen PP₁₃ enthält. Dieses Antiserum kann durch Absorption mit normalem menschlichen Serum und solchen Plazentafraktionen, die PP₁₃ nicht
20 enthalten, beziehungsweise mit gereinigten Plazentaproteinen (zum Beispiel HPL, PP₁₁, PP₁₂ und PP₁₆) gegen das
25 Antigen PP₁₃ weitgehend spezifisch gemacht werden.

Dieses Antiserum kann einerseits zum immunologischen Nachweis des PP₁₃, andererseits zur Herstellung eines Immunadsorbens dienen, das zur Anreicherung und Isolierung von PP₁₃ eingesetzt werden kann.
30

Mit Hilfe des nach der vorliegenden Anmeldung gewonnenen gereinigten PP₁₃ lassen sich durch Immunisieren von Tieren nach bekannten Methoden monospezifische Antiseren her-
35 stellen.

Abbildung 1a zeigt die immunologische Reaktion von PP_{13} mit einem spezifischen Antiserum vom Kaninchen nach Auftrennung im elektrischen Feld in Agar-haltigem Gel.

- 5 Abbildung 1b bringt zum Vergleich dazu die Auftrennung der Proteine des Serums, sichtbar gemacht durch deren Immunreaktion mit einem Antiserum vom Kaninchen gegen Humanserum (HS).
- 10 Zum immunologischen Nachweis von PP_{13} kann auch die Gel-diffusionstechnik nach Ouchterlony (vgl. Schultze and Heremans, Molecular Biology of Human Proteins, Vol.1, pg. 134) oder wenn notwendig auch empfindlichere Methoden wie Radioimmunoassays oder Enzymimmunoassays herangezogen werden.
- 15

Der Nachweis und die Bestimmung von PP_{13} haben diagnostische Bedeutung: PP_{13} ist ein plazenta-"spezifisches" Protein. Solche Proteine sind im allgemeinen mit fortschreitender Schwangerschaft in zunehmendem Maße im Serum erhöht; sie lassen sich daher als Parameter zur Überwachung der Schwangerschaft verwenden. Plazentaspezifische Proteine sind andererseits aber auch vielfach bei Patienten mit Tumoren - insbesondere bei trophoblastischen und embryonalen Tumoren - im Serum nachweisbar beziehungsweise im Gewebe der Tumoren lokalisiert; sie können daher bei solchen Erkrankungen als Marker zur Überwachung des Krankheitsverlaufs und zur Kontrolle der Therapie eingesetzt werden.

20

25

30 PP_{13} kann also verwendet werden, um Antiseren herzustellen, die dazu dienen können, PP_{13} nachzuweisen und zu bestimmen.

Die Erfindung wird am nachstehenden Beispiel erläutert:



BeispielA) Extraktion der Plazenten und Fraktionierung des
Extraktes mit Rivanol und Ammoniumsulfat

5

1.000 kg tiefgefrorene menschliche Plazenten wurden
im Schneidmischer zerkleinert und mit 1.000 Liter
einer 0,4 %igen (g/100ml) Kochsalzlösung extrahiert. Der
Extrakt wurde nach Abtrennung des Geweberückstandes
durch Zentrifugation mit 20 %iger (g/100ml) Essigsäure
auf pH 6,0 eingestellt und unter Rühren mit 200 Liter
einer 3 %igen (g/100ml) Lösung von 2-Äthoxy-6,9-Diamino-
acridin-Lactat (Rivanol^(R), Hoechst AG) versetzt. Der
Niederschlag wurde durch Zentrifugation abgetrennt, mit
500 Liter einer 2,5 %igen (g/100ml) NaCl-Lösung versetzt
und 4 Stunden gerührt. Das abgeschiedene Chlorid des
2-Äthoxy-6,9-Diaminoacridins wurde abzentrifugiert.
Der Überstand ist unter Rühren langsam mit soviel
festem Ammoniumsulfat versetzt worden, daß eine End-
konzentration von 30 % (g/100ml) erreicht wurde. Der Nie-
derschlag wurde abzentrifugiert. Es wurden dabei
4,5 kg einer feuchten Paste, die im Nachfolgenden als
Fraktion A bezeichnet wird, erhalten.

25

B) Gelfiltration an Sephadex G-150

1.200 g der Fraktion A wurden in Wasser gelöst und
gegen einen 0,01 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0), der
0,05 % (g/100ml) NaN_3 enthielt (Pufferlösung I), dialysiert.
Die zurückbleibende Lösung wurde auf eine mit Sepha-
dex G-150 gefüllte Säule (60 x 65 cm) aufgetragen und
mit Pufferlösung I eluiert. Die Eluate mit den nieder-
molekularen Proteinen (MG 10 000 - 40 000) wurden ver-
eignet und als Fraktion B bezeichnet.

35

C) Chromatographie an DEAE-Zellulose

Die Proteine der Fraktion B wurden an DEAE-Cellulose (Säule 10 x 28 cm) adsorbiert. Die Säule ist dann
5 mit Pufferlösung I gespült und mit 5 % (g/100ml) Kochsalzlösung eluiert worden. Das Eluat wurde auf einem Ultrafilter eingeeengt und gegen einen 0,1 M Tris-HCl-Puffer von pH 8, der 1 Mol/l NaCl und 0,1 % Natrium-
10 acid enthielt (Pufferlösung II), dialysiert (Fraktion C).

D) Anreicherung von PP₁₃ durch Immunadsorption

15 1. Herstellung des Immunadsorbens.

400 ml eines Anti-PP₁₃-Serums vom Kaninchen wurden gegen 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7,0) dialysiert und zur Abtrennung der Immunglobuline an DEAE-Cellulose chromatographiert. Die Immunglobulinfraction (4,69 g Protein) wurde dann mit 469 g
20 besonders gereinigter Agarose in Kugelform (Sephacrose^(R) der Pharmacia, Uppsala, Schweden), die mit 58,6 g Bromcyan aktiviert worden war, umgesetzt und so kovalent an einen Träger gebunden.
25 Das Verfahren wurde beschrieben von Axen R., Porath J., Ernback S., Nature 214, 1302 (1967). Mit Hilfe eines auf diese Weise hergestellten Immunadsorbens konnte PP₁₃ aus seinen Lösungen, insbesondere aus PP₁₃ angereicherten Plazentaextraktfraktionen isoliert werden.
30

2. Immunadsorption.

Das Immunadsorbens wurde in Pufferlösung II suspendiert, in eine Chromatographiesäule gefüllt
35 (5,5 x 22 cm) und mit Pufferlösung II nachgespült.

Dann wurde Fraktion C auf die Säule aufgetragen, wobei PP₁₃ immunadsorptiv gebunden wurde. Die Säule wurde dann gründlich mit Puffer II gespült; anschließend ist das adsorbierte Protein mit
5 etwa 600 ml 3 M Kaliumrhodanid-Lösung von der Säule eluiert worden. Die PP₁₃-haltigen Eluate wurden gegen Pufferlösung II dialysiert und mit einem Ultrafilter auf etwa 20 ml eingeeengt. Ausbeute pro Adsorption \sim 10 mg PP₁₃. Das Adsorbens in der
10 Säule wurde unmittelbar nach der Elution von PP₁₃ wieder mit Pufferlösung II neutralisiert und gründlich gewaschen; es ist dann erneut zur immunadsorptiven Bindung von PP₁₃ eingesetzt worden.

15

E) Hochreinigung von PP₁₃
-----13

Das durch Immunadsorption gewonnene Protein war häufig durch unspezifisch gebundene Serumproteine und
20 andere Plazenta-Gewebsproteine verunreinigt. Die Abtrennung der Hauptmenge der Serum-Begleitproteine gelang durch Gelfiltration an Sephadex G-100. Die restlichen Begleitproteine wurden dann durch inverse oder negative Immunadsorption, das heißt mit Hilfe von
25 trägergebundenen Antikörpern gegen die noch als Verunreinigung vorliegenden Proteine (HPL, PP₁₂, PP₁₆ und Serumproteine) entfernt.

Patentansprüche

1. Protein PP₁₃, gekennzeichnet durch
 - a) eine elektrophoretische Beweglichkeit im Bereich von Albumin,
 - 5 b) einen isoelektrischen Punkt von $4,75 \pm 0,15$,
 - c) einen Sedimentationskoeffizienten $S_{20,w}^0$ von $3,1 \pm 0,15$ S,
 - d) ein in der Ultrazentrifuge bestimmtes Molekulargewicht von $30\ 000 \pm 5\ 000$,
 - 10 e) ein im Natriumdodecylsulfat (SDS)-haltigen Polyacrylamidgel bestimmtes Molekulargewicht von $29\ 000 \pm 3\ 000$,
 - f) einen Extinktionskoeffizienten $E_{1cm}^{1\%}$ (280 nm) von $9,8 \pm 0,3$ und
 - 15 g) einen Kohlenhydratanteil von $< 1\%$ ($0,1 \pm 0,05\%$ Mannose, $0,2 \pm 0,1\%$ Galactose, $0,1 \pm 0,05\%$ Xylose, $0,2 \pm 0,1\%$ Glucosamin, Neuraminsäure nicht nachgewiesen).
2. Verfahren zur Gewinnung des Proteins nach Anspruch 1,
20 dadurch gekennzeichnet, daß ein Extrakt aus menschlichen Plazenten, der ein Protein mit den im Anspruch 1 angegebenen Parametern enthält, einer geeigneten Kombination von mehreren zur Isolierung von Proteinen bekannten Verfahrensmaßnahmen unterworfen wird, wobei
25 jeweils das Material gewonnen wird, welches das Protein mit den angegebenen Eigenschaften enthält, und das Protein gewonnen wird.
3. Verfahren zur Anreicherung des Proteins nach Anspruch
30 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Extrakt aus menschlichen Plazenten mindestens einer der folgenden Maßnahmen unterworfen wird und die an PP₁₃ angereicherte Fraktion gewonnen wird:

- 1) Fällung mit Ammoniumsulfat im pH-Bereich von
5 bis 8 und bei 30 - 50 % Sättigung;
- 2) Fällung mit einer wasserlöslichen Acridinbase bei
einem pH-Wert zwischen 4 und 9 und einer Konzen-
5 tration der Base von 0,2 - 0,8 g/100 ml;
- 3) Elektrophoretische Auftrennung bei pH 8,0 und
Gewinnung der Fraktion mit einer Beweglichkeit
von Albumin;
- 10 4) Isoelektrische Fokussierung im pH-Bereich von
4,6 bis 4,9;
- 5) Gelfiltration zur Gewinnung von Proteinen mit
Molekulargewichten von 10 000 bis 40 000;
- 6) Adsorption an einen schwach basischen Ionenaus-
15 tauscher und Elution des Proteins;
- 7) Immunadsorption.
4. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 zur Her-
stellung spezifischer Antikörper gegen dieses Pro-
20 tein.
5. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 in immu-
chemischen Methoden zum Nachweis und zur Bestim-
mung dieses Proteins.





**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.